

EÖTVÖS LORÁND TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR  
MIKROBIOLÓGIAI TANSZÉK

RUSZNYÁK ANNA

DIVERZITÁS VIZSGÁLATOK MAGYARORSZÁGI SZIKES VIZEK  
NÁDASAINAK BIOFILM BAKTÉRIUMKÖZÖSSÉGEIN

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

ELTE BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

ISKOLAVEZETŐ: PROF. DR. ERDEI ANNA

KÍSÉRLETES NÖVÉNYBIOLÓGIA DOKTORI PROGRAM

PROGRAMVEZETŐ: PROF. DR. SZIGETI ZOLTÁN

TÉMAVEZETŐ: DR. BORSODI ANDREA  
PH.D., EGYETEMI DOCENS

BUDAPEST  
2008

## 1. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉS

A szigorúan védett szikes élőhelyek Magyarországon jelentős természeti értéket képviselnek egyedülálló geológiai, hidrológiai, botanikai és zoológiai sajátosságainak köszönhetően. A nagy nyíltvízi felülettel és állandó vízborítottsággal jellemezhető Fertő és Velencei-tó mellett különleges szikes környezetek a kiskunsági „székek”, melyek igen sekély, nyár végén gyakran teljesen kiszáradó, alkalikus és enyhén sós vízterek. Hazánk másik nagy kiterjedésű szikes térsége a Tiszántúlon található, melynek sekély vizű szikes tavait viszonylag magas ionkoncentráció, lúgosság, sófelhalmozódás, nagyfokú egyedi és szezonális változatosság jellemzi.

A nád (*Phragmites australis* /Cav./ Trin et Steudel) Európa és Magyarország különböző tájainak flóraleíró munkáiban közönséges fajként szerepel. Nagy kiterjedésben megtalálható nagy tavaink (a Balaton, a Fertő, a Velencei-tó) és az alföldi szikes tavak parti régiójában. A tó és tágabb környezete életében a nádasok egyrészt víztisztító funkciójuk, másrészt trofikus kapcsolatokban játszott szerepük miatt nagyon jelentősek. Az ELTE Mikrobiológiai Tanszékén a nádasok környezetének megismerését célzó mikrobiológiai kutatások a Fertőn és a Velencei-tavon esetében kezdődtek meg. Ezek a vizsgálatok elsősorban a nádnövénnyel kapcsolatban álló aerob és anaerob baktériumközösségek faji összetételét és anyagcsere aktivitását vizsgálták. Az alföldi szikes vízterek esetében eddig csak az üledék aerob baktériumközösségek feltérképezése történt meg. A nádszarak víz alatti részén kialakuló biofilmek aerob baktériumközösségeinek faji struktúrájára, a nádnövénnyel kialakított lehetséges szerepére vonatkozó ismereteink azonban meglehetősen szórványosak. A nád biofilm szerkezetének és működésének ismerete az adott víztérben azért lényeges, mert felépítése és összetétele alapján jól elkülöníthetők a környezettenél különböző élőhelyek, minőségének és mennyiségének alakulása pedig a vízminőségi állapotot, illetve annak megváltozását tükrözi. Természetes környezetekben betöltött szerepének ismerete nagyon fontos lehet a szennyvízkezelési célból létesített mesterséges vizes élőhelyek mikrobiológiai folyamatainak optimalizálásában, hatékonyságának növelésében.

Munkánk során hazánk három szikes tava: a Velencei-tó, a kiskunsági Kelemen-szék és a tiszántúli Nagy-Vadas tó nádasállományainak biofilmjében található baktériumközösségek metabolikus potenciálját és faji diverzitását kívántuk feltérképezni.

Jelen munka egyik célja a vizsgált biofilm minták közösségi szintű anyagcseréjének és szezonális dinamikájának megismerése volt. További célként tűztük ki a biofilm minták baktériumközösségeinek szerkezetében megfigyelhető területi különbségek, illetve a

szézonális dinamika feltárását. Ennek érdekében tavasszal, nyáron és ősszel végzett évszakos mintavételeket követően BIOLOG GN2 és ECO lemezek felhasználásával közösségi szénforrás értékesítési vizsgálatokat végeztünk. A baktériumközösségek genetikai diverzitását és annak változását dentauráló gradiens gélelektroforézis (DGGE) segítségével tanulmányoztuk.

Az elvégzett vizsgálatok másik célja a vizsgált nád biofilmek alkotásában résztvevő, tenyésztethető aerob baktériumközösségek mennyiségi viszonyainak csíraszámbecslés segítségével történő meghatározása, és a baktériumközösségekből izolált törzsek morfológiai, fiziológiai és ökológiai tolerancia tesztek alapján történő jellemzése volt.

Célul tűztük ki továbbá mindhárom tó esetében a nád biofilm baktériumközösségek filogenetikai diverzitásának feltárását, tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független molekuláris klónozásos vizsgálatok eredményeinek összehasonlításával.

## **2. AZ ALKALMAZOTT MÓDSZEREK**

Mivel a mikrobiális ökológiai kutatásokban alkalmazott módszerek mindegyike önmagában csak korlátozott mértékben alkalmas a teljes mikrobiális diverzitás feltárására, munkánk során a rendelkezésünkre álló tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független módszerek kombinálásán alapuló ún. polifázikus megközelítést alkalmaztunk. A mintavételi időpontokat és az egyes mintákkal elvégzett vizsgálatokat az 1. táblázat foglalja össze.

Mindegyik mintavételi területen a vízfelszín alól kb. 10 cm-es mélységből 5-8 db 15-20 cm hosszú nádszálat gyűjtöttünk, mind a fiatal, mind pedig a többéves nádasállományból. A minták bakteriológiai feldolgozása során az egyes mintavételi területekről származó párhuzamos mintákból homogenizált preparátumot készítettünk úgy, hogy a nádszálak külső felületéről steril ecset segítségével fiziológiás sóoldatba mostuk a bevonatot. Az 1. táblázatban jelölt, megfelelően szuszpendált és hígított mintákból tenyésztésen alapuló csíraszámbecslést végeztünk 5 különféle táptalajon, majd a különálló kolóniák közül véletlenszerűen a lemezekkel azonos összetételű ferde agarra törzseket izoláltunk. A baktériumtörzseket részletes kulturális- és sejtmorfológiai, biokémiai-élettani vizsgálatoknak vetettük alá. A tisztított baktériumtörzsek fenotípusos tulajdonságait hagyományos tesztsorozatok segítségével vizsgáltuk. Ezt követően elvégeztük a törzsek genotípusos csoportosítását ARDRA (Amplified Ribosomal DNA Restriction Analyses; PCR reakcióban

felszaporított riboszomális DNS restrikciós mintázatának elemzése) révén. A pontos faji meghatározás érdekében a csoportrepresentánsok 16S rDNS-ét parciálisan szekvenáltuk.

A táblázatban feltüntetett mintákra a kiindulási szuszpenziókból tenyésztés nélküli, ún. közösségi szénforrás értékesítési vizsgálatot is végeztünk BIOLOG (GN2 mindhárom tó, ECO a Velencei-tó három mintavételi területének esetében) lemezek felhasználásával. Az eredményeket főkomponens analízis segítségével, valamint az értékesített szubsztrátok típusa alapján hasonlítottuk össze.

A 2000 és 2001 évi minták kivételével, az összes minta esetében a centrifugálással koncentrált nád biofilm szuszpenziókból teljes közösségi DNS-t is izoláltunk. Ezek közül a 2004. áprilisában a Kelemen-székről és a Nagy-vadasról, illetve a 2006. májusában a velencei-tavi Lángi-tisztásról vett mintákból a baktériumokra (Bacteria domén) jellemző 16S rDNS szakaszokat PCR segítségével felszaporítottuk, majd az egyes fajokra jellemző génszakaszokat klónozással választottuk el egymástól. Az ily módon szeparált DNS szakaszokat ezt követően szekvenáltuk és nemzetközi adatbázisokban elhelyezett 16S rDNS szekvenciákkal összehasonlítva azonosítottuk. A többi minta esetében (1. táblázat) a specifikus PCR reakcióban felszaporított 16S rDNS szakaszokat denaturáló gradiens gélelektroforézis (DGGE) technika révén választottuk szét, és az egyes mintákat az eltérő elektroforetikus mintázataik (a csíkok elhelyezkedése és intenzitása) alapján statisztikai módszerekkel (Phoretix programcsomag) hasonlítottuk össze.

<b>Mintavételi hely</b>	<b>Mintavételi időpont</b>	<b>BIOLOG GN2 plate</b>	<b>BIOLOG ECO plate</b>	<b>DGGE</b>	<b>Tenyésztés</b>	<b>Klónozás</b>
Velencei-tó (Fürdető, Agárd- Gárdony- Hosszúisztás, Lángi-tisztás)	2000. 04.	X			X	
	2001. 07.	X			X	
	2003. 05.	X		X		
	2003. 08.	X		X		
	2003. 10.	X		X		
	2006. 05.		X	X		X
	2006. 08.		X	X		
Kelemen- szék és Nagy- Vadas	2006. 10.		X	X		
	2004. 04.				X	X
	2005. 05.	X		X		
	2005. 07.	X		X		
	2005. 11.	X		X		
	2006. 05.	X		X		
	2006. 07.	X		X		
2006. 10.	X		X			

1. táblázat Az egyes területeken végzett mintavételek időpontjai és az elvégzett vizsgálatok (Az adott minta esetében alkalmazott módszert X jelöli.)

### 3. AZ ÉRTEKEZÉS EREDMÉNYEI ÉS A KÖVETKEZTETÉSEK

A közösségi szintű mikrobiális anyagcsere mintázatokat BIOLOG GN2 és ECO lemezek felhasználásával követtük nyomon. A Velencei-tó esetében kétféle mintatípust vizsgáltunk annak érdekében, hogy a nagyméretű nádasállományok esetleges elhelyezkedésbeli (nádasállományok belső és nyíltvízes kapcsolattal rendelkező külső részből származó minták), illetve kor (egy- és többéves nádszár minták) szerinti különbségeit feltárjuk a biofilm mikrobaközösségek vonatkozásában. A főkomponens analízis eredményei alapján az egyes mintatípusok mikrobaközösségei nem mutattak egyértelmű elkülönülést szénforrás értékesítésük alapján, ezért a későbbi szezonális vizsgálatokhoz mindhárom tó esetében a nyíltvízzel érintkező külső nádasállományból gyűjtöttünk fiatal és többéves nádszárakat vegyesen. A Velencei-tó esetében mindkét típusú (GN2 és ECO) BIOLOG lemez adatainak elemzése az egyes minták szezonális csoportosulását eredményezte. Az ordinációs diagramokon a vizsgált években a tavaszi minták helyezkedtek el a legközelebb egymáshoz, míg a nyáriak jelentős területi elkülönülése volt megfigyelhető. Az alföldi szikes tavak vizsgálati eredményei alapján az egyes évek tavaszi és nyári mintái egymáshoz nagyfokú hasonlóságot mutattak, azonban a két évet összehasonlítva különböztek egymástól. Valamennyi időpontban és területen vett minta mikrobaközösségeit a különféle szubsztrát csoportok közül a polimerek és a szénhidrátok preferált hasznosítása jellemezte.

Összességében megállapítható, hogy a GN2 és az ECO lemezekkel végzett vizsgálataink egyaránt a közösségi szintű szénforrás hasznosítási mintázatokat a Velencei-tó mintavételi területei szerinti eltérő szezonális dinamikájára engedtek következtetni. Az ECO lemezek ugyanakkor az egyes mikrobaközösségek aktivitásának összehasonlítására alkalmasabbnak bizonyultak, mint a GN2 lemezek, mivel a GN2 lemezek számos olyan az ECO lemezek nem található, de a baktériumok által könnyen hasznosítható szénhidrátot tartalmaznak, amelyek többségét a vizsgált minták mikrobaközösségeinek mindegyike jól értékesítette. A GN2 lemezek mért abszorbancia adatok főkomponens analízise ezért a minták anyagcsere-ujjlenyomatában sokkal kisebb összvarianciát eredményezett.

A BIOLOG GN2 lemezekkel végzett két éves szénforrás értékesítési vizsgálatok főkomponens értékei a Kelemen-szék és a Nagy-Vadas nád biofilm mikrobaközösségek esetében a velencei-tavi mintákhoz képest az összvariancia közel kétszeresét magyarázták. A jelenség magyarázata feltehetően az lehet, hogy a Velencei-tóval összehasonlítva a szélsőségesen változó vízforgalommal és fiziko-kémiai paraméterekkel jellemezhető alföldi szikes vízterek nádasállományán fejlődő biofilm közösségek anyagcsere aktivitásuk nagyfokú

változásában is tükrözik mikrokörnyezetük változását. A partszegélyén található nádasok ezen vízterek esetében ugyanis a velencei-tavinál sokkal kevésbé összefüggőek és kisebb kiterjedésűek, így a víztestben kialakuló változások kifejezettebben és közvetlenebbül befolyásolhatják a nád biofilm mikrobaközösségeinek szerkezetét és aktivitását.

A mindhárom szikes tóról származó nád biofilm baktériumközösségek szerkezetében bekövetkező szezonális változásokat és az egyes fajok relatív abundanciáját DGGE-vel vizsgáltuk. A Velencei-tó esetében az eltérő helyekről és különböző időpontokban gyűjtött minták baktériumközösségeit reprezentáló csíkok mintázata és a sávok intenzitása alapján a legnagyobb hasonlóságot mindkét évben az ugyanarról a mintavételi területről eltérő időpontokban gyűjtött minták baktériumközösségeinek sávmintázatai mutatták. A korábbiakban ismertetett közösségi szintű mikrobiális anyagcsere nyomon követését célzó BIOLOG vizsgálatok eredményei elsősorban a szezonális dinamikára, míg a DGGE vizsgálatok eredményei inkább a mintavételi területek közti különbségekre utalnak. A látszólagos ellentmondás háttérében feltehetően a Velencei-tó egyes területein előforduló eltérő fajösszetételű, de hasonló anyagcsere potenciállal rendelkező, szezonálisan változó baktériumközösségek állhatnak. A kelemen-széki nád biofilm minták DGGE sávmintázatauk alapján elsődlegesen a mintavétel éve szerint váltak szét, és a baktériumközösségek egyes tagjainak abundancia-változásaiban a BIOLOG eredmények főkomponens analízisével megegyező csoportosulást figyelhettünk meg. A Nagy-Vadasról származó minták baktériumközösségei DGGE sávmintázatauk alapján kevésbé egyértelmű csoportosulást mutattak. Megállapíthatjuk tehát, hogy a kétféle közösségi szintű vizsgáló módszer alkalmasnak bizonyult a vizsgált nád biofilm minták közösségeinek vizsgálatára, azonban az egyes területek, illetve a szezonális dinamika jellemzéséhez további részletesebb, több mintavételi pontra kiterjedő, és gyakoribb mintavétellel egybekötött vizsgálatosorozatra volna szükség.

A Velencei-tó mindhárom mintavételi területéről vett nád biofilm mintákban tavasszal a csíraszám értékek a nyáriakhoz képest több nagyságrenddel magasabbak voltak. A velencei-tavi területek közül tavasszal a Fürdető csíraszám értékei több esetben is egy nagyságrenddel magasabbak voltak a másik két területről származó mintákénál, valamint a kétféle minta típus értékei is nagyságrendi eltérést mutattak a szerves anyagban gazdag táptalajokon. A különböző területekről származó nyári minták csíraszám értékei között nem volt nagyságrendi különbség, ugyanakkor volt olyan táptalaj, amelyen a vizsgált két mintatípus becsült csíraszámai mindhárom területen egy nagyságrendnyi különbséget mutattak. A négyféle táptalajon megfigyelt értékeket összehasonlítva mindhárom tó mintáinak esetében többnyire a

*Caulobacter* táptalajon figyeltük meg a legmagasabb becsült csíraszámokat. A Kelemen-szék és a Nagy-Vadas nád biofilm baktériumainak vizsgálataihoz a mesterséges tengervizes táptalaj bizonyult a legalkalmasabbnak a bakteriális diverzitásának tenyésztési módszerekkel történő feltárására.

A három tó nád biofilm mintáiból kitenyésztett törzsállományok közül a velencei-tavi törzsek alapvetően fakultatív fermentatív metabolizmussal bírtak. Ezen belül a Gram-negatív dominanciájú tavaszi minták törzseit inkább a gyors, míg a döntően Gram-pozitív festődésű nyári minták törzseit a lassú fermentatív aktivitás jellemezte. A vizsgált szubsztrátok közül a tavaszi törzsekre a keményítő és a tween 80 hasznosítása, a nyári minták izolátumaira az eszkulin és a kazein hidrolízise volt jellemző. A kiskunsági Kelemen-szék és a tiszántúli Nagy-Vadas tó kitenyésztett baktériumainak többsége Gram-pozitív festődésű volt, a kitenyésztett baktériumok a vizsgált tesztekben a velencei-taviakhoz képest alacsony aktivitást mutattak. A velencei-tavi törzsállományokkal ellentétben az alföldi törzsek teszteredményei alapvetően aerob légző anyagcserére utaltak. Említésre méltó, hogy a Velencei-tóból egyáltalán nem, a Kelemen-szék és a Nagy-Vadas esetében is csak néhány cellulóz bontó szerveget sikerült kimutatnunk. Az általunk vizsgált biofilm minták minden esetben egészséges nádnövények száráról származtak, ezért nem meglepő a cellulózbontó szervek hiánya/kis száma a vizsgált biofilmek baktériumközösségeiben.

Az ARDRA-csoportosítást követően a reprezentatív törzsek azonosításának eredményei alapján mindhárom tó nád biofilm baktériumközösségeinek széles diverzitását sikerült feltárnunk. Az egyes területekről származó mintákból azonosított taxonok számában és egymáshoz viszonyított arányában jellegzetes eltéréseket tapasztaltunk, valamint az egyes filogenetikai törzsekhez tartozó nemzetségek és fajok összetételében is csak részleges átfedéseket lehetett megfigyelni.

A velencei-tavi nád biofilm minták közül tavasszal és nyáron is a tó nyugati természetvédelmi területén található Lángi-tisztásról származó mintákból azonosítottuk a legtöbb baktérium taxont, a legkevesebbet pedig a nyíltvízes területen található Fürdető mintáiból. A Nagy-Vadas mintájából a Lángi tisztás mintáival közel egyező számú taxont azonosítottunk. A legtöbb baktérium taxont ugyanakkor a Kelemen-szék nád biofilmjéből határoztuk meg. Az utóbbi két szikes tóból származó törzsek közül több alacsony ( $\leq 97\%$ ) szekvencia-hasonlóságot mutatott már leírt fajokkal, ennek alapján lehetséges, hogy ezek a törzsek új fajok képviselői.

A tavaszi és nyári velencei-tavi minták törzseinek azonosítását összehasonlítva részben átfedő faji szerkezetet állapíthatunk meg. Az  $\alpha$ -proteobaktériumok más-más

nemzetségeit azonosítottuk tavasszal és nyáron, a  $\beta$ -proteobaktériumokat csak a tavaszi minta törzsei képviselték. A  $\gamma$ -proteobaktériumok körébe tartozó *Aeromonas* nemzetség mind a tavaszi, mind a nyári nád biofilm minták tenyészthető közösségalkotójának bizonyult, azonban a tavaszi minta törzsállományában a nyáriénál nagyobb számú törzs képviselte ezt a nemzetséget. A fenotípusos tesztek alapján a tavaszi velencei-tavi minta gyors fakultatív fermentatív aktivitással rendelkező tenyészthető baktériumközösségként volt jellemezhető, feltételezhető, hogy a jelenség mögött többek között az azonosítás révén feltárt faji összetétel, ezen belül az *Aeromonas*ok említett nagy száma állhat. A kis G+C tartalmú Gram-pozitív baktériumok közé relatíve kevés törzs került a Velencei-tó tavaszi mintáiban, míg nyáron a második legnagyobb számú törzscsoport képviselte ezt a törzset. A feltárt sokféleség tekintetében azonban a tavaszi minták bizonyultak diverzebbnek. A nyáron izolált és ebbe a csoportba sorolt, többségükben vegyessavas fermentációt mutató törzsek túlnyomó részét *Bacillus pumilus*ként azonosítottuk. A nyári mintavétel alkalmával kitenyésztett közösségekre inkább a lassú, egy héten belül megfigyelhető fermentatív aktivitás volt jellemző, ennek egyik feltételezhető oka többek között a *Bacillus* és rokon nemzetségekbe tartozó törzsek nagy száma lehet.

A velencei-tavi tavaszi minták törzsállományán kívül a többi esetben a nagy G+C tartalmú Gram-pozitív baktériumokat képviselte a legtöbb törzs, és összességében ennek a filogenetikai csoportnak tártuk fel tenyésztéssel a legszélesebb (*Arthrobacter*, *Aureobacterium*, *Cellulomonas*, *Dietzia*, *Kocuria*, *Micrococcus*, *Microbacterium*, *Nesterenkonia*, *Nocardiopsis*, *Plantibacter*, *Rhodococcus*, *Sanguibacter*, *Streptomyces*) diverzitását.

A két alföldi szikes tó közül a Kelemen-szék nád biofilm mintájából kitenyésztett baktériumok azonosításának eredményei a Nagy-Vadasnál nagyobb átfedést mutattak a velencei-tavi minták általunk tenyésztéssel detektált faji összetételével. A nagy G+C tartalmú Gram-pozitív baktériumok számos, a  $\beta$ -proteobaktériumok *Acidovorax* és *Hydrogenophaga* nemzetségeinek, az *Agrobacterium*, valamint az Enterobacteriaceae család egyes tagjainak jelenlétét a Nagy-Vadas nád biofilm mintájában nem, csak a kiskunsági Kelemen-szék esetében sikerült igazolnunk. Az alföldi szikes tavak esetében több olyan nemzetséget (*Paracoccus*, *Halomonas*, *Planococcus*, *Nesterenkonia*) sikerült kimutatnunk, amelyek képviselőinek jelenléte a vizsgált szikes vizek nádon kialakuló biofilm baktériumközösségeinek szikes környezethez való alkalmazkodására utal.

A tenyésztéses vizsgálatok révén a *Pseudomonas* és a *Bacillus* nemzetségek képviselőinek jelenlétét az összes vizsgált nád biofilm minta baktériumközösségében



igazoltuk. A három tó biofilm mintáiból a *Pseudomonas*, a *Bacillus* és a vele közelrokon nemzetségek fajainak csak részben átfedő, de összességében nagy fajgazdaságát (*P. anguilliseptica*, *P. fluorescens*, *P. fragi*, *P. gessardi*, *P. marginalis*, *P. putida*, *P. stutzeri*; *B. cereus*, *B. firmus*, *B. fusiformis*, *B. horikoshii*, *B. licheniformis*, *B. pumilus*, *Brevibacillus agri*, *Marinibacillus campisalis*, *Marinibacillus marinus*, *Paenibacillus* sp., *Jeotgallibacillus* sp.) tártuk fel. Ezek a metabolikus sokféleségükről ismert fajok növény-asszociált mikrobaközösségek tagjaként széles körben elterjedtek a különféle vízi környezetekben.

Az egyes tavak nád biofilm baktériumközösségeinek diverzitását molekuláris klónozással is feltérképeztük. A velencei-tavi Lángi-tisztást a korábbi eredmények alapján választottuk a tenyésztéstől független vizsgálatra. Az alföldi szikes területek esetében a tenyésztéssel is feldolgozott nád biofilm mintákból izolált közösségi DNS-ből hoztunk létre klónkönyvtárat. A klónozás révén mindhárom minta esetében a nád biofilm alkotásában résztvevő baktériumközösségek széles diverzitását tártuk fel. A könyvtárak közös sajátossága volt, hogy klónjaik jelentős hányada eddig tenyésztésbe nem vont szervezetek szekvenciáival mutatott nagyfokú hasonlóságot. A klónok vizsgálata mindhárom tó esetében a nád biofilm baktériumközösségek Gram-negatív dominanciájára engedett következtetni. Egyedül a Kelemen-szék klónjai között találtunk a Gram-pozitív *Arthrobacter* nemzetséghez tartozó képviselőt, melyet tenyésztéssel is sikerült igazolnunk a minta baktériumközösségében. A tenyésztéssel feltárt mikrobaközösségek összetételében gyakran megfigyelhető jelenség a Gram-pozitív, illetve endospóra képző szervezetek túlsúlya. A molekuláris klónozást megelőző DNS izolálás során előfordulhat egyes baktériumok (pl. a sejtfal-szerkezeti eltérések miatti) preferenciális feltáródása és ennek következtében nagyobb arányú detektálása az adott mintában. A három klónkönyvtár klónjai a reprezentánsok identifikációja révén az  $\alpha$ -,  $\beta$ - és  $\gamma$ -proteobaktériumokat és a Bacteriodetes csoportot képviselték. Ezek közül  $\beta$ -proteobaktériumokat csak a Velencei-tó egyes területeiről és a Kelemen-székről sikerült kis számban kitenyésztünk. A Bacteriodetes csoportba tartozó szervezeteket kizárólag a Kelemen-szék biofilm baktériumai között azonosítottuk tenyésztéses eljárással is. A fenti két csoport képviselői klónozásos vizsgálatok alapján gyakran bizonyulnak különféle környezeti minták, köztük növény-asszociált mikrobióta abundáns tagjainak, ahol sokrétű szerepet tölthetnek be a növény és szűkebb környezete életében. Az adatbázisokban fellelhető viszonylag kevés tenyésztésbe vont Bacteriodetes baktériumot képviselő szekvencia szintén azt jelzi, hogy a tenyésztésen alapuló vizsgálatok továbbfejlesztése nagymértékben hozzájárulhat a csoport sokféleségének és aktivitásának megismeréséhez.

A fenti csoportokon kívül mindhárom minta esetében azonosítottunk olyan csoportokat klónozás segítségével, amelyeket az általunk választott és alkalmazott tenyésztési feltételek mellett nem detektálhattunk a nád biofilm baktériumközösségek tagjaként. Ilyenek voltak a Lángi-tisztás esetében a Verrucomicrobia, Gemmatimonadetes, Spirochaetes, Chlorobi és Chloroflexi csoportok, a Kelemen-szék biofilm mintájában a Fibrobacter/Acidobacteria, valamint a Nagy-Vadas nád biofilmjében a Chloroflexi csoport.

A Lángi-tisztás reprezentatív klónjainak azonosítása révén a faj/nemzetség szintjén azonosított taxonok egyikét sem mutattuk ki tenyésztéssel az adott minta biofilm baktériumai között. A két alföldi szikes nád biofilm minta esetében is rendkívül csekély átfedést tapasztaltunk ebben a tekintetben (*Agrobacterium*, *Hydrogenophaga* és *Arthrobacter* nemzetségek a Kelemen-szék, *Paracoccus* nemzetség a Nagy-Vadas mintájában). Az *Agrobacterium* és a *Hydrogenophaga* nemzetségek tagjainak mindhárom tó nád biofilmjében való jelenlétét csak a két diverzitás elemző módszer ötvözésével sikerült igazolnunk.

Munkánk során az alkalmazott módszerek lehetővé tették, hogy betekintést nyerjünk a vizsgált növény-asszociált biofilmek baktériumainak potenciális metabolikus aktivitásába, valamint filogenetikai és taxonómiai diverzitásába. A közösségi szintű anyagcserét feltérképezni hivatott BIOLOG szénforrás értékesítési tesztek és a baktériumközösségek szerkezetének megismerésére használt DGGE módszerrel kapott eddigi eredményeink alapján arra következtethetünk, hogy az egyes mintavételi területek, illetve a szezonális dinamika megbízható feltérképezéséhez további hosszú távú, gyakori mintavételezéssel kivitelezett vizsgálatok szükségesek. A tenyésztéses és a klónozásos vizsgálatok eredményeinek részleges átfedése a két mikrobiális ökológiai diverzitás vizsgáló módszer eltérő szelektivitására utal. A tenyésztéses vizsgálatok kibővítésével (pl. további táptalajok bevonásával, a tenyésztési technikák módosításával) a szikes tavak nádasain kialakuló biofilmek baktériumközösségeinek eddig még feltáratlan, rejtőzködő diverzitására is fényt derülhet.

#### 4. A TÉZISEK ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ KÖZLEMÉNYEK

##### Referált tudományos folyóiratokban megjelent cikkek:

**Rusznyák A.**, Vladár P., Molnár P., Reskóné N.M., Kiss G., Márialigeti K., Borsodi A.K. 2008. Cultivable bacterial composition and BIOLOG catabolic diversity of biofilm communities developed on *Phragmites australis*. Aquatic Botany 88: 211-218.

**Rusznyák A.**, Szabó G., Pollák B., Vágány V., Palatinszky M. 2007. Diversity of reed (*Phragmites australis*) stem biofilm bacterial communities in two Hungarian soda lakes. Acta Microbiol. Immunol. Hung. 54: 339-352.

Borsodi A.K., **Rusznyák A.**, Molnár P., Vladár P., Reskóné N.M., Tóth E.M., Sipos R., Márialigeti K. 2007. Metabolic activity and phylogenetic diversity of reed (*Phragmites australis*) periphyton bacterial communities in a Hungarian shallow soda lake. Microbial Ecology 53: 612-620.

**Rusznyák A.**, Borsodi A., Vladár P., Molnár P., Reskóné N.M., Ács É. 2003. Velencei-tavi nád biofilm baktériumközösségek vizsgálata klasszikus és molekuláris módszerekkel. Hidrológiai Közlöny 83 (I-XII): 127-129.

##### EGYÉB PUBLIKÁCIÓK

##### Referált tudományos folyóiratokban megjelent cikkek:

Borsodi A.K., Micsinai A., **Rusznyák A.**, Vladár P., Kovács G., Tóth E.M., Márialigeti K. 2005. Diversity of alkaliphilic and alkalitolerant bacteria cultivated from decomposing reed rhizomes in a Hungarian soda lake. Microbial Ecology 50 (1): 9-18.

Borsodi A., Vladár P., **Rusznyák A.**, Szabó G., Sipos R., Márialigeti K. 2005. Tenyésztésen alapuló és tenyésztéstől független molekuláris biológiai vizsgálatok a Kiskunsági NP szikes tavainak baktériumközösségein. Hidrológiai Közlöny 85 (6): 23-25.

##### Teljes közlemény konferencia kiadványban:

Borsodi A.K., Vladár P., **Rusznyák A.**, Sipos R., Tóth E.M., Márialigeti K. 2004. Application of BIOLOG metabolic and DGGE genotypic fingerprint methods for studying sediment bacterial communities of Hungarian soda lakes. In: Proceedings of the 9th Methodological workshop: Present methods for investigation of microbial community biodiversity in soils and substrates. Chroňáková A., Krišťůfek V., Elhottová D., Malý S. (eds). Institute of Soil Biology AS CR, České Budějovice (CD pp. 73-78).